

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年8月19日 (19.08.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/069862 A1(51) 国際特許分類:
A61K 31/80, A61P 7/02, 7/04, 7/08

C07K 7/08,

Makoto) [JP/JP]; 〒1500001 東京都渋谷区神宮前3丁目38番16号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2004/001293

(74) 代理人: 庄司 隆 (SHOJI, Takashi); 〒1010032 東京都千代田区岩本町3丁目2番10号 SN岩本町ビル6階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2004年2月6日 (06.02.2004)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2003-029847 2003年2月6日 (06.02.2003) JP
特願2004-017046 2004年1月26日 (26.01.2004) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田2丁目15番45号 Tokyo (JP). 三菱ウェルファーマ株式会社 (MITSUBISHI PHARMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5410046 大阪府大阪市中央区平野町2丁目6番9号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 武岡 真司 (TAKEOKA, Shinji) [JP/JP]; 〒1580094 東京都世田谷区玉川3丁目40番16号 Tokyo (JP). 池田 康夫 (IKEDA, Yasuo) [JP/JP]; 〒1120002 東京都文京区小石川3丁目17番20号 Tokyo (JP). 半田 誠 (HANDA,

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PEPTIDE CONJUGATE

(54) 発明の名称: ペプチド結合体

(57) Abstract: It is intended to provide a platelet substitute which would not undergo aggregation together with inactive platelets in a blood vessel and thus never induces unnecessary thrombosis or coagulation in the blood vessel. More specifically, it is found out that a conjugate having a dodecapeptide contained in the GPIIb/IIIa recognition site of fibrinogen bonded thereto has a characteristic preferable as a platelet substitute, i.e., specifically binding exclusively to activated GPIIb/IIIa.

(57) 要約: 血管中で未活性な血小板と凝集を起こして不要な血栓の生成や血液の血管内凝固を誘導しない、特異的な凝集作用を有する血小板代替物を提供すること。詳しくは、フィブリノーゲンのGPIIb/IIIa認識部位に含まれるドデカペプチドを結合させた結合体が、実質的に活性化されたGPIIb/IIIaとのみ特異的に結合する、血小板代替物として好ましい性質を有することを見いだして、本発明を完成させた。

BEST AVAILABLE COPY



WO 2004/069862 A1

明細書

ペプチド結合体

本出願は、参照によりここに援用されるところの、日本特許出願番号
5 2003-029847 号及び日本特許出願番号 2004-017046 号からの優先権を請求する。

技術分野

本発明は血小板代替機能を有するペプチド結合体に関する。特に、活性化した
血小板を特異的に認識するオリゴペプチドの微粒子との結合体、該結合体を含む
10 血小板代替物、該結合体による血小板凝集の制御方法、該結合体の製造方法、及
び該結合体を含む診断薬からなる。

背景技術

血小板減少症等の疾患、あるいは抗癌剤などの化学療法の使用に際して一時的
15 に血小板数が減少する場合に、出血傾向及び出血した場合に血が止まり難い症状
が現れる。この症状への処置法として、ヒト血小板製剤の投与が行われるが、ヒ
ト由来であるためにウィルスや病原菌の感染リスクの問題があり、しかも血小板
製剤の保存期間は室温で3日間と非常に短いために、これらを解決できる血小板
代替物の開発が急務となっている。

20 ヒトより採取した血小板から成る血小板製剤は、血小板減少症などの処置に不
可欠であるが、保存期間が短いこと、また、感染症リスクの問題等があることか
ら、長期保存可能な血小板代替物の研究が行なわれてきた。

これまで、血小板代替物として、古くは、ヒト血小板をパラホルムアルデヒド
で固定化し、凍結乾燥した物が知られている（特許文献1参照）。これは、血小
25 板膜上のGPIIbの活性のみを残しつつ、固定化処理によって血小板の代謝機能を
失活させることにより長期保存を可能にした物である。最近では、血小板の膜
上に存在し血小板の粘着または凝集に関与することが知られている糖タンパク

である、GPIbやGPIIb/IIIaなどの機能性高分子を、何らかの微粒子の表面に結合させた物が知られている。これらのうち、GPIbを有する物は、GPIbとフォンビルブラント因子（vW因子）の相互作用に基づく粘着作用を有することによって血小板の代替物として働くことが期待され、一方、GPIIb/IIIaを有する物は、GPIIb/IIIaとフィブリノーゲン及び／又はvW因子の相互作用に基づく凝集作用を有することによって血小板の代替物として働くことが期待されている。

また、これらの機能性高分子を結合させる微粒子としては、小胞体（リポソーム）などの脂質膜、ヒトアルブミンまたはその重合体、あるいはヒト赤血球などが知られている。具体的には、小胞体（リポソーム）を微粒子としてGPIbを結合させた物（特許文献2参照）、ヒトアルブミン重合体を微粒子としてGPIbを結合させた物（特許文献3参照）、小胞体（リポソーム）を微粒子としてGPIIb/IIIaを結合させた物（非特許文献1参照）等が知られている。

また、上記の物は、機能性高分子を1種類のみ有する物であるが、GPIb及びGPIIb/IIIaの両方を有する血小板代替物も知られている。具体的には、血小板上のGPIIb/IIIaを活性化させた後にパラホルムアルデヒドで固定化させた物（特許文献4参照）が知られている。

一方、これらのように、血小板上の機能性高分子を有することによって血小板代替物として働くのではなく、患者血液中に残存する血小板の活性を補助することにより血液の凝集を誘導する物も知られており、これらも血小板代替物とみなすことができる。例えば血小板上のGPIIb/IIIaと相互作用を起こすことにより血液凝集を誘導する物が知られている。具体的には、小胞体（リポソーム）にRGD配列（Arg-Gly-Asp）を有するペプチド（配列表2）を結合させた物（非特許文献2参照）、ヒトアルブミン重合体にフィブリノーゲンを結合させた物（非特許文献3参照）、ヒトアルブミンにフィブリノーゲンのGPIIb/IIIa認識部位に含まれるドデカペプチド（His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-V

a 1) を含むペプチドを結合させた物 (特許文献 5 参照) 等が知られている。

先行文献

- (特許文献 1) 米国特許第 4, 287, 087 号
- 5 (特許文献 2) 特開平 9-208599 号、米国特許第 6, 177, 059 号及び欧州特許公開第 0894807 号各号公報
- (特許文献 3) 特開 2001-151800 号公報
- (特許文献 4) 特開 2001-131078 号公報
- (特許文献 5) 米国特許第 4, 661, 471 号
- 10 (非特許文献 1) M. E. Rybak, Thrombosis and Haemostasis, 55, 240-245, 1986
- (非特許文献 2) T. Nishiya, and S. Sloan, Biochim. Biophys. Res. Commun., 224, 242-245, 1996
- (非特許文献 3) S. Takeoka et al., Biomacromolecules, 2, 1192-1197, 2001

15 発明の開示

- 血小板代替物を製造するにあたり最も注意すべきことの一つは、製造した血小板代替物が、必要とされる場合以外にも血管中で凝集を起こすことにより血栓の生成あるいは血液の血管内凝固を誘導し、血管閉塞など重大な副作用を生じさせることがないように、血小板代替物の凝集能力を制御することにある。事実、ヒト
- 20 血小板においては、GPIIb/IIIa は通常状態では未活性であり、必要に応じてのみ活性化される。この制御機構により、生体中では、不要な血栓の生成や血液の凝固が抑制されている。しかしながら、固定化血小板、あるいは担体に GPIIb/IIIa を結合させた従来の血小板代替物において、このような制御機構を備えた物は知られていない。
- 25 一方、患者血液中に残存する血小板の活性を補助することにより血液の凝固を誘導する血小板代替物は、血小板上の活性化 GPIIb/IIIa を利用したフィブリノーゲンの結合や血小板の凝集を必要とする。しかし、本発明者らの研究

により、微粒子にRGD配列を有するペプチドを結合させた血小板代替物は、GPIIb/IIIaが未活性な状態である血小板に対しても、その未活性なGPIIb/IIIaを介して血小板と結合する作用を有することが明らかとなった。これは、血小板の活性を補助する血小板代替物であっても、不要な血栓の生成や血液の血管内凝固などの副作用を有する可能性があることを示している。また、微粒子にフィブリノーゲンを結合させた物についても、活性化したGPIIb/IIIaのみとの特異的結合作用を有することが期待されるが、フィブリノーゲンの不安定性に問題があることが示唆されている（上記の非特許文献3参照）。そのほか、フィブリノーゲンのGPIIb/IIIa認識部位に含まれる

10 ドデカペプチド部分を含むペプチドを結合させた物についても、従来技術においてその具体的な態様は十分明らかにされておらず、安定性などの性状及び具体的な作用効果については、何一つ明らかにされていない（上記の特許文献5参照）。

以上のことから、血管中で未活性な血小板と凝集を起こして不要な血栓の生成や血液の血管内凝固を誘導しない、特異的な凝集作用を有する血小板代替物が、

15 現在も要求されている。

本発明者らは、特異的な凝集作用を有する血小板代替物について鋭意研究を行った結果、フィブリノーゲンのGPIIb/IIIa認識部位に含まれるドデカペプチドの合成体を微粒子に結合させたペプチド結合体が、実質的に活性化されたGPIIb/IIIaとのみ特異的に結合する、血小板代替物として好ましい性質を有することを見いだして、本発明を完成させた。また、本発明の血小板代替物にはヒト由来の成分を用いておらず、それら成分の合成体及び遺伝子組換え体を用いているため、ウイルス等の感染リスクは回避される。

20

すなわち本発明の内容は、以下のとおりである。

1. 一般式

25 「(微粒子) - [(リンカー) - Cys-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val-COOH]_n」、
あるいは一般式

「(微粒子) - [(スペーサー) - (リンカー) - Cys-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val-COOH]_n」である結合体。

(式中、nは整数)

- 5 2. 微粒子が、小胞体、ミセル、蛋白質重合体、合成高分子の何れかーから選ばれる前項1記載の結合体。
3. 微粒子が、小胞体、組換えアルブミン重合体、ラテックス粒子、生分解性高分子の何れかーから選ばれる前項1または2に記載の結合体。
4. 微粒子の粒子径が、50nm以上である前項1～3の何れかーに記載の結合体。
- 10 5. 微粒子の粒子径が、10μm以下である前項1～4の何れかーに記載の結合体。
6. リンカーが、片末端がSH基と反応し、もう片末端がOH基、COOH基、NH₂基のいずれかーと反応する化合物である前項1～5の何れかーに記載の結合体。
7. リンカーが、ジカルボン酸、アミノカルボン酸、ビスマレイミド化合物、ビスハロカルボニル化合物、ハロカルボニルマレイミド化合物、ジチオマレイミド、
- 15 ジチオカルボン酸及びマレイミドカルボン酸の何れかーから選ばれる前項1～6の何れかーに記載の結合体。
8. リンカーが、ジカルボン酸、アミノカルボン酸、ビスマレイミド化合物、ビスハロカルボニル化合物、ハロカルボニルマレイミド化合物、ジチオマレイミド、ジチオカルボン酸及びマレイミドカルボン酸の何れかーであり、かつ炭素鎖がC
- 20 2～10である前項1～7の何れかーに記載の結合体。
9. スペーサーが、ポリオキシエチレン、ポリペプチド、多糖、アルブミン及び抗体から選ばれる1又はこれらの複数の組み合わせからなる前項1～8の何れかーに記載の結合体。
10. 微粒子がラテックス粒子、スペーサーがアルブミン、リンカーがジチオカルボン酸である前項1～9の何れかーに記載の結合体。
- 25 11. 微粒子が小胞体、スペーサーがポリエチレングリコール、リンカーがマレイミドカルボン酸である前項1～9の何れかーに記載の結合体。

12. 前項1～11の何れかーに記載の結合体を含む血小板代替剤。
13. 前項1～11の何れかーに記載の結合体による血小板凝集の制御方法。
14. 前項1～11の何れかーに記載の結合体の製造方法。
15. 前項1～11の何れかーに記載の結合体を含む診断薬又は試薬。
- 5 16. 血小板機能異常症の診断薬、生物学的・医学的な試薬、血小板凝集抑制剤、抗血栓剤のスクリーニング用の試薬、血管損傷部位及び血栓形成部位の検査用診断薬又は治療剤である前項15の診断薬又は試薬。
17. 前項1～11の何れかーに記載の結合体を含む薬物運搬体。
18. 薬物が止血剤、血管収縮剤、抗炎症剤、抗血液凝固剤、抗血小板剤の何れ
- 10 かーから選択される前項17に記載の結合体を含む薬物運搬体。
19. 前項1～11の何れかーに記載の結合体を含む医薬組成物。
20. 薬物が止血剤、血管収縮剤、抗炎症剤、抗血液凝固剤、抗血小板剤の何れ
- かーから選択される前項19に記載の結合体を含む医薬組成物。
21. 血管障害、血管損傷及び血栓症の予防又は治療のための前項19又は20
- 15 記載の医薬組成物。

図面の簡単な説明

- 図1：血小板のコラーゲン基板への粘着占有率の経時変化を示す。
- 図2：ドデカペプチド結合ラテックスビーズ（H12-LB）のコラーゲン基板への
- 20 粘着占有率の経時変化を示す。
- 図3：流動後の基板のSEM観察図を示す。
- 図4：未活性血小板に対する結合性試験としての膠着率を示す。
- 図5：小胞体へのH12導入量と血小板凝集効果を示す。
- 図6：血小板のコラーゲン基板への粘着占有率を示す。

本発明のペプチド結合体は、一般式

「(微粒子) - [(リンカー) - Cys-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val-COOH]_n」、

あるいは一般式

- 5 「(微粒子) - [(スペーサー) - (リンカー) - Cys-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val-COOH]_n」である。式中、nは整数である。ドデカペプチドである「His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val」は、フィブリノーゲンのGP11b/IIIa認識部
- 10 位に含まれるアミノ酸配列（配列表1）であり公知である。この配列は、自体公知の合成手段によって合成可能であり特に限定されるものではない（The Peptides Analysis, Synthesis, and Biology Vol.2, pp.1-284, Academic Press(1980)）。末端のカルボキシル基はアミノ酸Val由来である。

- 式中、微粒子とは医療用の非経口投与が可能な担体を意味し、生体適合性を有
- 15 する限りは特に限定されない。これまでに公知の好適な微粒子材料としては、小胞体、ミセル、蛋白質重合体、合成高分子などが知られており、具体的には小胞体（リポソーム）、組換えアルブミン重合体、ラテックス粒子、生分解性高分子等が例示される。

- 小胞体（リポソーム）は脂質人工膜で構成される粒子でリン脂質、グリセロ糖
- 20 脂質、コレステロール等から脂質二重層としてつくられる。その調製には、界面活性剤除去法、水和法、超音波法、逆相蒸留法、凍結融解法、エタノール注入法、押し出し法、及び高圧乳化法等広く公知方法が適用される。小胞体（リポソーム）の調製の詳細は上記特許文献2及び非特許文献2に詳しく記載されている。小胞体（リポソーム）は、本発明の実施例及び実験例で使用されたが、適宜生体適合
- 25 性を有するものが選択され使用される。

組換えアルブミンは、既知の遺伝子工学的手法により製造されたものが利用でき特に制限されない。例えば、実用化レベルにある宿主として酵母を用いて生産

される組換えアルブミンは好適である。アルブミンの微粒子化（重合）は公知であり、特開 2001-151800 号公報の本発明者等によるアルブミン重合体の調製法が好適である。また組換えアルブミンの調製法は以下のような方法に詳しく記載されており（特開平 5-317079, 同 6-56883, 同 6-245789, 同 8-116985 各号公報）、こ
5 れらの方法で実施例 1 で使用する r HSA を得た。

ラテックス粒子は、本発明の実験例で使用されたが、適宜生体適合性を有するものが選択され使用される。生分解性高分子は例えば、乳酸及び/又はグリコール酸を重合して得られる高分子を微粒子化して調製される。生体内ではこれらは経時的に分解又は溶解性の性質を持つように分子量・共重合体組成や配合比が決
10 定され使用される。

このようにして調製される微粒子の粒子径は、表面認識部位の導入量とその機能発揮、および体内動態の面から、約 50nm 以上が好ましく、また、約 10 μ m 以下が好ましい。更に、好ましくは約 50nm～約 500nm、より好ましくは約 100nm～約 400nm である。

15 式中リンカーは微粒子とペプチド末端の SH 基と架橋できるもので、公知の生体許容性があるものならば特に限定されないが、好ましくは片末端が SH 基と反応し、もう片末端が OH 基、COOH 基、NH₂ 基のいずれかと反応する化合物である。このようなリンカーとしては、例えば、ジカルボン酸、アミノカルボン酸、ビスマレイミド化合物、ビスハロカルボニル化合物、ハロカルボニルマレイミド化合
20 物、ジチオマレイミド、ジチオカルボン酸及びマレイミドカルボン酸等が例示される。これらは炭素鎖が C2-10 であることが好ましい。

式中スペーサーは、微粒子とリンカー間にあつて微粒子表面とペプチド間の長さを調節できるものであり、生体適合性があれば特に限定されないが、ポリオキシエチレン、ポリペプチド、多糖、アルブミン、及び抗体から選ばれる 1 又はこ
25 れらの複数の組み合わせからなる物質を利用できる。アルブミンや抗体は組換え体利用できる。

微粒子上に結合されるドデカペプチドの分子数は、高密度であることが血小板

との結合の可能性を高め、凝集塊の形成が迅速に進むことから好適である。式中 n は整数を意味し、微粒子に結合するドデカペプチドの数を表す。その数は、適宜その所望凝集度及び凝集速度に応じて当業者は変異可能であり調整できる。例えば、実験例 4 に示すように小胞体（リボソーム）を使う場合は、ドデカペプチドによる修飾率の最適値（例えば 0.3mol%-0.6mol%）が特定可能であり、同様に条件を変え、最適化が達成される。一定値以下の修飾率では効果が不十分であり、一定値以上の修飾率では効果に影響しなくなる。

微粒子、リンカー又はスペーサーリンカー、及びドデカペプチドの結合体の調製は、微粒子の調製後、必要であれば微粒子表面の活性化によって化学結合可能にし、ついで必要なリンカー又はスペーサーリンカーを結合させ、さらにはドデカペプチドを反応させることによって調製される。或は、予めリンカー又はスペーサーリンカーとドデカペプチドの反応産物を調製しておき、最終的に活性化された微粒子と結合させてもよい。反応条件は、各微粒子に適合した自体公知の手法が適用可能である。ドデカペプチドと微粒子の混合比は、最終的な結合体におけるドデカペプチドの密度の所望値によって調節される。

小胞体の場合、脂質二重層の構成成分と成り得るドデカペプチドを結合させた両親媒性分子をあらかじめ小胞体を構成する脂質類と有機溶媒中で混合させておき、常法にて小胞体を調製することによって小胞体表面をドデカペプチドで修飾することができる。

次いで要すれば、本発明の結合体は、生理的に許容される水溶液で洗浄し、除菌濾過、分注を行い、液状製剤、ペレット状及び懸濁状製剤として調製する。製剤化は医薬品の製法において広く公知の方法に準ずる。また、本製剤は液状製剤を凍結させた後、減圧下で乾燥させ、凍結乾燥製剤としても提供される。なお、凍結乾燥する場合は保護剤として、単糖類（例えば、ブドウ糖等）、二糖類（例えば、蔗糖等）等を配合してもよい。本発明の製剤にはアルブミン、デキストラン、ビニル重合体、ゼラチン及びヒドロキシルエチル澱粉から選ばれた高分子物質を安定化剤として配合してもよい。当該安定化剤の添加量は脂質 1 重量部に対

して、0.5～10重量部、好ましくは1～5重量部である。

かくして調製された本発明の結合体を含む製剤は、活性化された血小板のGPIIb/IIIaと選択的な結合性をしめすことから、血管中で未活性な血小板とは凝集を起こすことはなく、血管損傷部位等の血小板の活性化した部位での血小板との凝集が期待でき、血小板凝集の制御手段を提供する。本発明の結合体はそれ自体で合成血小板の代替物となりうる。又本発明の結合体は、血管損傷部位等の血小板の活性化した部位への集積性を有するために、薬物含有組成物（薬物運搬体）としての態様を取ることもできる。このような薬物としては、血管損傷部位へ集積させることによって生理学的、薬理学的に有効であるものであれば特に制限はなく、例えば、止血剤、血管収縮剤、抗炎症剤、抗血液凝固剤、抗血小板剤等が挙げられる。本発明の結合体は、ドデカペプチドとして、1日当たり0.001～1000mg程度を投与することができる。その投与量は患者の性別、年齢、症状等に応じて適宜増減できる。本発明の結合体は、より好ましくは非経口的に投与される。具体的には、血管内（動脈内・静脈内）への注射、持続点滴、皮下投与、局所投与あるいは筋肉内投与等が例示される。本発明の結合体を含む医薬組成物としては、血小板代替剤、血管障害、血管損傷及び血栓症等の予防・治療等の医薬品、あるいは血小板無力症などの血小板機能異常症の診断薬、生物学的・医学的な試薬、血小板凝集抑制剤・抗血栓剤のスクリーニング用の試薬等がある。血管損傷部位及び血栓形成部位の検査用診断薬あるいは治療剤としても有用である。

実施例

以下、製造例、実験例をあげて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

25

実施例1 ドデカペプチド〔以下H12と記す。（配列表1）〕結合ラテックスビーズ（以下H12-LBと記す）合成法

組換えヒト血清アルブミン（以下 rHSA と記す）溶液 (50mg/mL, 1.5mL) に粒子径 1 μ m のラテックスビーズ (以下 LB と記す) 分散液を混合し、振とうさせた (20°C, 2hr)。遠心分離 (13000g, 5min, 4°C, 3times) によって LB を沈殿させ、未吸着 rHSA を上清として除去後、phosphate-buffered saline (以下 PBS と記す, 500 μ L) に
5 よって再分散させた。

HSA 吸着 LB 分散液 [以下 (HSA) LB と記す] (4.0x10⁶ particles/ μ L, 500 μ L) に、SPDP (*N*-スクシンイミジル 3,2-ピリジルジチオプロピオネート) エタノール溶液 (5mM, 5 μ L) を添加し、振とうさせた (20°C, 30min.)。遠心分離 (13000g, 5min, 4°C, 3times) によって未反応 SPDP や副生成物を除去して、pyridyl
10 disulfide (以下 PD と記す) 結合 (HSA) LB [以下 PD-(HSA) LB と記す] を得た。この PD-(HSA) LB (4.0x10⁶ particles/ μ L, 500 μ L) に Cys-H12 (末端に Cys が付加された H12) (10mM, 8 μ L) を混合し、振とうさせた (20°C, 12hr)。遠心分離 (13000g, 5min, 4°C, 3times) によって上清を除去後、H12-LB (2.0x10⁶ particles/ μ L, 1mL) を得た。LB 表面の H12 結合量は thiol-disulfide 交換反応で生成される
15 2-thiopyridone (以下 2TP) の 343nm の吸収から決定した (HPLC, TSK-GEL G3000SWXL column, 7.8mm o.d. x 300mm h, 1mL/min, PBS)。

実施例 2 H12 (配列表 1) 結合小胞体 (以下 H12-PEG 小胞体と記す) 合成法

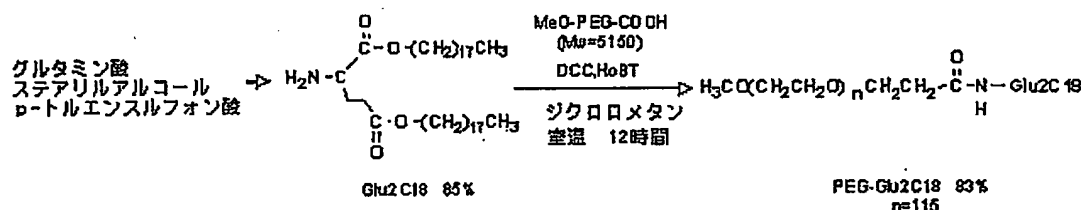
H12-PEG-Glu2C18 の対照として、PEG-Glu2C18 を合成した。グルタミン酸 (2.96g, 20mmol)、*p*-トルエンスルホン酸一水和物 (4.56g, 24mmol) をベンゼン 150ml に溶解させ、Dean-Stark 装置をもちいて 105°C で生成水を除去しながら、1 時間還流させた。ステアリルアルコール (11.9mg, 44mmol) を加え、105°C で生成水を除去しながらさらに 14 時間還流させた。溶媒を減圧蒸留した後、残分をクロロホルム 150ml に溶解させ、炭酸ナトリウム飽和水溶液 150ml で 2 回、水 150ml で
25 2 回洗浄した。クロロホルム層を回収し、硫酸ナトリウム 5g で脱水後、溶媒を減圧除去した。残分を 60°C でメタノール 400ml に溶解させ、不溶成分があればろ過し、4°C で再結晶、濾過後乾燥して白色粉末 Glu2C18 (13.3g, 収率 85%) (式 1 参

照)を得た。

この Glu2C18 (50.08mg, 76.8 μ mol) と MeO-PEG-COOH (α -カルボキシル- ω -メトキシポリエチレングリコール) (Mw=5150) (200mg, 38.4 μ mol) 及び HOBT (1-ヒドロキシ-ベンゾトリアゾール) (5.2mg, 38.4 μ mol) をジクロロメタン 5ml 中に溶解させた後、DCC (*N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド) (9.58mg, 46.4 μ mol) を加え、12 時間攪拌した。不溶成分を濾過にて除去後、反応溶液をジエチルエーテル 250ml に滴下し、不溶成分を回収した。回収物をベンゼンに溶解させて凍結乾燥をおこない、白色粉末 PEG-Glu2C18 (204mg, 収率 83%) ($n=115$) (式 1 参照) を得た。式 1 にその合成概略を示す。

10

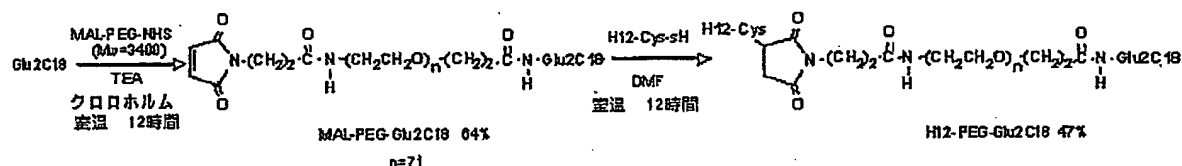
(式 1)



一方、本発明の H12-PEG-Glu2C18 を以下のように調製した。クロロホルム 5ml 中に Glu2C18 (115.1mg, 176 μ mol)、TEA (トリエチルアミン) (24.6 μ l, 176 μ mol) を加えた後に、MAL-PEG-NHS (α -マレイミジル- ω -*N*-ヒドロキシスクシンイミジルポリエチレングリコール) (Mw=3400) (300mg, 58.8 μ mol) を溶解させ、室温で 12 時間攪拌させた。反応溶液をジエチルエーテル 250ml に滴下し、不溶成分を回収した。回収物をベンゼン中に溶解し凍結乾燥をおこない、白色粉末 MAL-PEG-Glu2C18 (264.8mg, 収率 64%) (式 2 参照) を得た。この MAL-PEG-Glu2C18 ($n=71$) (100mg, 25.37 μ mol) と Cys-H12 (32.8mg, 25.37 μ mol) を DMF 5ml に溶解し、室温で 12 時間攪拌させた。反応溶液をジエチルエーテル 250ml に滴下し、不溶成分を回収した。水 250ml を加え不溶成分を除去後、凍結乾燥機にて溶媒を除去し、淡黄色粉末 H12-PEG-Glu2C18 (62.8mg, 収率 47%) (式 2 参照) で得た。式

2にその合成概略を示す。

(式 2)



- 5 ついで上記調製された PEG-Glu2C18 及び H12-PEG-Glu2C18 を使い小胞体の表面に H12 を導入させた。DPPC (100mg, 136 μ mol) 及び コレステロール (52.7mg, 136 μ mol) に対して PEG-Glu2C18 及び/又は H12-PEG-Glu2C18 を任意の比で加えた混合脂質をベンゼン 5ml に溶解し、凍結乾燥を 3 時間行った。乾燥後、純水 10ml を加え 12 時間攪拌したのち造粒装置 (Extruder) を用いて貫通孔を有するフィ
- 10 ルターを透過させて粒径制御を行った。フィルターは孔径 {3000nm \rightarrow 800nm \rightarrow 650nm \rightarrow 450nm \rightarrow 300nm \rightarrow 220nm (x2)} の順番で通過させた。超遠心分離 (33000rpm, 30 分) を 2 回おこない、PBS 5ml 中に分散させ小胞体分散液とした。PEG-Glu2C18 及び/又は H12-PEG-Glu2C18 の含有量について、PEG-Glu2C18 (4.74mg, 0.817 μ mol) のみを含む小胞体を PEG-小胞体、
- 15 H12-PEG-Glu2C18 (4.34mg, 0.817 μ mol) のみを含む小胞体を H12-PEG 小胞体、PEG-Glu2C18 (4.74mg, 0.817 mol) \cdot H12-PEG-Glu2C18 (14.34-0.43mg, 2.72-0.0817 mol) を含む小胞体を H12-PEG (PEG) 小胞体と定義した。

なお、調製されたリン脂質小胞体 (H12-PEG 小胞体 \cdot 1.8wt%) を PBS で 30 倍希釈し 37°C で 12 時間振とう後、超遠心 (33000rpm, 1h) にて小胞体を沈殿、分散させ、さらに凍結乾燥した粉末を $^1\text{H-NMR}$ 測定した。DPPC、コレステロール、

20 H12-PEG-Glu2C18 のモル比は H12-PEG 小胞体を 37°C で 12 時間振とうさせても変化がなかったことから H12-PEG-Glu2C18 はリン脂質小胞体からは脱離せず、安定担持されていることが確認できた。

実験例1 担体にラテックスビーズを使った場合の血小板との凝集試験

血小板減少モデル血液は、全血を重力落差で赤血球製剤用白血球除去フィルター(NE01J, 日本ポール社)を通過させ、多血小板血漿(PRP)を添加して血小板濃度 $2.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$ となるように調製した(自動血球計測装置 K-4500, Sysmex, Kobe)。

- 5 血小板減少モデル血液 5mL 中に H12-LB ($1.0 \times 10^5 \text{ particles} / \mu\text{L}$) を添加し、静置後 (37°C , 10min.), コラーゲン固定化基板上にポンプを用いて流動させ (ずり速度 150 s^{-1})、蛍光顕微鏡あるいは CCD カメラを通して観察した。各基板に対する微粒子の粘着占有率 [surface coverage (以下 SC と記す)] は、画像解析装置 (Argus-50、浜松フォトニクス) によって測定した。
- 10 血小板にのみ蛍光標識 [3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC_6)] をして経時的に粘着挙動を観察した。その結果、血小板の基板への SC は時間経過と共に増大し、180 秒後では $3.1 \pm 0.4\%$ であった [図 1 : □, control]。また、この傾向は、LB を添加しない系、即ち、血小板のみの系のそれとほぼ変わらないことから [$3.0 \pm 0.6\%$ 、図 1 : ⊙]、LB のみによる血小板粘着への影響は生じないこ
- 15 とが示唆された。そこで、LB の代わりに H12-LB を添加したところ、血小板粘着は LB 添加時よりも増幅され、180 秒後では $5.1 \pm 0.3\%$ であり、control よりも約 1.7 倍増幅された [図 1 : ○]。

- 他方、FITC で LB を標識した H12-LB 及び LB の粘着挙動を観察したところ、H12-LB の場合の初期粘着速度は図 1 に示した血小板のそれと比較して非常に緩やかであったが、SC は徐々に増大した [図 2 : △]。また、血小板濃度が $0.2 \times 10^4 / \mu\text{L}$ のとき H12-LB の基板への結合数は抑制され [図 2 : ⊗]、さらに LB ではほとんど結合しなかった [図 2 : □]。
- 20

- そこで、流動後の基板を SEM (Scanning Electron Microscope) 観察したところ、コラーゲン基板上にまず血小板が粘着した後に H12-LB が結合し、さらに別
- 25 の血小板による H12-LB を巻き込んだ粘着が確認できた (図 3)。

以上より、コラーゲン基板に対する H12-LB の粘着は血小板の存在によって誘導され、コラーゲンに粘着し活性化した血小板上に H12-LB が結合し、さらに流

動血小板がそれを介して誘導・粘着し、次々と両者の積層が生じたことが確認できた。

実験例 2 未活性血小板に対する結合性試験

- 5 未活性血小板 ($2.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$) に対して各 LB、H12-LB、及び CGGRGDF-LB [RGD 配列 (Arg-Gly-Asp) を有するペプチドを結合した LB] を $1.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$ 混合し、振とう (37°C , 30min) し、それぞれの膠着率をフローサイトメトリーによって評価した。その結果、LB、H12-LB は膠着率の上昇は見られなかったが、CGGRGDF-LB は $2.9 \pm 1.3\%$ であった (図 4)。このことから、H12-LB は CGGRGDF-LB
- 10 より未活性血小板に膠着しにくいことが確認できた。

実験例 3 小胞体への H12 導入量と血小板凝集効果

- クエン酸ナトリウム水溶液 (3.8%) を全血に 1/9 (v/v) 添加し、遠心分離 (600rpm, 15min) を行い、多血小板血漿 (PRP) を得た。沈殿成分を更に遠心分離
- 15 (2500rpm, 10min) して、乏血小板血漿 (PPP) を得た。PRP、PPP を混合し血小板減少血漿 ($180 \mu\text{L}$, $[\text{PLT}] = 10 \times 10^4 / \mu\text{L}$) を調製した。これに小胞体分散液 $10 \mu\text{L}$ を添加した後、ADP (アデノシン-5'-二リン酸) ($300 \mu\text{M}$) $10 \mu\text{L}$ を添加し、血小板を凝集させた。

- 凝集計による測定は PPP を透過度 100%、血小板減少血漿を透過度 0% としたとき
- 20 の凝集による透過度の増大を測定し、PEG-小胞体を添加した場合に対して、同濃度の H12-PEG (PEG) 小胞体を添加した場合の透過度の差を評価した。

H12-PEG-Glu2C18 を 0.1mol%、0.2mol%、及び 0.3mol% で含む小胞体いずれにおいても血小板凝集の促進が認められたが、小胞体への H12 導入量が増加するほど、血小板の凝集を促進した (図 5)。

25

実験例 4 担体に小胞体を使った場合の血小板との凝集試験

血小板を DiOC_6 にて蛍光標識し、血小板減少血液 ($[\text{血小板}] = 5.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$) 5mL

に H12-PEG (PEG) 小胞体 (1.5wt%, 200 μ L) を添加し、静置後 (37°C, 10min)、コラーゲン基板上をずり速度 150 s^{-1} にて流動させ蛍光顕微鏡にて観察した。血小板の基板への SC は Argus-20 にて解析した。血小板減少血液 ([血小板] = $5.0 \times 10^4 / \mu$ L) に、H12-PEG 小胞体 (H12-PEG-Glu2C18 : 0.3mol%) あるいは PEG 小胞体を
 5 添加し、コラーゲン基板上を流動させたところ、H12-PEG 小胞体添加系は PEG-小胞体添加系と比較して SC が増大した (表 1)。

(表 1) H12-PEG (PEG) 小胞体 と H12-PEG 小胞体の存在下での血小板凝集の促進

Samples	SC of platelets (%)
PEG小胞体	9.6 \pm 0.9
H12-PEG小胞体	15.0 \pm 5.0
H12-PEG(PEG)小胞体	17.3 \pm 1.9

10

これは、血小板がまずコラーゲン基板に粘着し、粘着した血小板にリン脂質小胞体が結合して流動している血小板との結合部位を増やし、リン脂質小胞体にさらに血小板が結合したため SC が増大したと考えられる。また、H12-PEG (PEG) 小胞体について、同条件にて基板上を流動させたところ、H12-PEG (PEG) 小胞体添加
 15 系についても同様に PEG 小胞体添加系と比較して SC が増加した (表 1)。これにより、血中滞留性向上のために小胞体表面へ PEG 脂質を導入しても H12 の認識反応は阻害されないことが示された。

次に H12-PEG の修飾率の異なる H12-PEG (PEG) 小胞体を血小板減少血液に添加した場合のコラーゲン基板上への血小板の SC は、図 6 のようになった。これは、
 20 H12-PEG-Glu2C18 修飾率 0.1mol% 以下では基板への血小板の SC が PEG 小胞体とほぼ同じであり、修飾率 0.3mol% 以上では修飾率とともにその効果も現れることを示した。これは、コラーゲンにて活性化した血小板への H12-PEG (PEG) 小胞体の粘

着数が H12-PEG-Glu2C18 の修飾量につれて増加したためであると考えられた。

実験例 5 担体に小胞体を使った場合の血小板との相互作用

血小板減少血漿([血小板]= $5.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$) $80 \mu\text{L}$ を調製し、蛍光標識した

- 5 H12-PEG(PEG)小胞体 ($8.2 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{L}$)、または蛍光標識した抗体と H12-PEG(PEG)小胞体 ($0.082 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{L}$) を添加後、攪拌 (30min , 37°C) した。続いてホルムアルデヒド (3.7%) 固定、10 倍希釈後フローサイトメトリーを用いて計測した。

- H12-PEG(PEG)小胞体を添加した血小板について、表 2 より抗体の結合量が PBS や PEG 小胞体を血小板に添加した系と変わらなかった。また、H12-PEG(PEG)小胞体そのものも血小板とほとんど相互作用していなかった。従って、血流中にて H12-PEG(PEG)小胞体は正常血小板と相互作用せず、活性化しないことを確認した。このことから、H12-PEG(PEG)小胞体は未活性血小板に膠着しにくいことが確認できた。

(表 2) 血小板への PAC-1 の結合

Samples	PAC-1 binding (%)	vesicle binding (%)
PBS	3.8 ± 0.9	-
PEG小胞体	3.4 ± 0.3	1.3 ± 0.7
H12-PEG(PEG)小胞体	3.7 ± 0.4	1.4 ± 0.6

15

産業上の利用可能性

- フィブリノーゲンの GPIIb/IIIa 認識部位に含まれる合成ドデカペプチドを結合させた結合体は、実質的に活性化された GPIIb/IIIa とのみ特異的に結合し、血管中で未活性な血小板と凝集を起こすことにより血栓の生成あるいは血液の血管内凝固を誘導することがない。また、本発明のペプチド結合体にはヒト由来の成分を用いておらず、それら成分の合成体及び遺伝子組換え体を用いているため、感染リスクは回避される。従って、本発明のペプチド結合

体は血小板代替物として有用である。

請求の範囲

1. 一般式

「(微粒子) - [(リンカー) - Cys-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val-COOH]_n」、
 あるいは一般式

「(微粒子) - [(スペーサー) - (リンカー) - Cys-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val-COOH]_n」である結合体。

10 (式中、nは整数)

2. 微粒子が、小胞体、ミセル、蛋白質重合体、合成高分子の何れかーから選ばれる請求項1記載の結合体。

3. 微粒子が、小胞体、組換えアルブミン重合体、ラテックス粒子、生分解性高分子の何れかーから選ばれる請求項1または2に記載の結合体。

15 4. 微粒子の粒子径が、50nm以上である請求項1～3の何れかーに記載の結合体。

5. 微粒子の粒子径が、10 μ m以下である請求項1～4の何れかーに記載の結合体。

6. リンカーが、片末端がSH基と反応し、もう片末端がOH基、COOH基、NH₂基のいずれかーと反応する化合物である請求項1～5の何れかーに記載の結合体。

20 7. リンカーが、ジカルボン酸、アミノカルボン酸、ビスマレイミド化合物、ビスハロカルボニル化合物、ハロカルボニルマレイミド化合物、ジチオマレイミド、ジチオカルボン酸及びマレイミドカルボン酸の何れかーから選ばれる請求項1～6の何れかーに記載の結合体。

8. リンカーが、ジカルボン酸、アミノカルボン酸、ビスマレイミド化合物、ビスハロカルボニル化合物、ハロカルボニルマレイミド化合物、ジチオマレイミド、
 25 ジチオカルボン酸及びマレイミドカルボン酸の何れか1であり、かつ炭素鎖がC2～10である請求項1～7の何れかーに記載の結合体。

9. スペーサーが、ポリオキシエチレン、ポリペプチド、多糖、アルブミン及び抗体から選ばれる1又はこれらの複数の組み合わせからなる請求項1～8の何れかーに記載の結合体。
10. 微粒子がラテックス粒子、スペーサーがアルブミン、リンカーがジチオカルボン酸である請求項1～9の何れかーに記載の結合体。
11. 微粒子が小胞体、スペーサーがポリエチレングリコール、リンカーがマレイミドカルボン酸である請求項1～9の何れかーに記載の結合体。
12. 請求項1～11の何れかーに記載の結合体を含む血小板代替剤。
13. 請求項1～11の何れかーに記載の結合体による血小板凝集の制御方法。
- 10 14. 請求項1～11の何れかーに記載の結合体の製造方法。
15. 請求項1～11の何れかーに記載の結合体を含む診断薬又は試薬。
16. 血小板機能異常症の診断薬、生物学的・医学的な試薬、血小板凝集抑制剤、抗血栓剤のスクリーニング用の試薬、血管損傷部位及び血栓形成部位の検査用診断薬又は治療剤である請求項15の診断薬又は試薬。
- 15 17. 請求項1～11の何れかーに記載の結合体を含む薬物運搬体。
18. 薬物が止血剤、血管収縮剤、抗炎症剤、抗血液凝固剤、抗血小板剤の何れかーから選択される請求項17に記載の結合体を含む薬物運搬体。
19. 請求項1～11の何れかーに記載の結合体を含む医薬組成物。
20. 薬物が止血剤、血管収縮剤、抗炎症剤、抗血液凝固剤、抗血小板剤の何れかーから選択される請求項19に記載の結合体を含む医薬組成物。
21. 血管障害、血管損傷及び血栓症の予防又は治療のための請求項19又は20記載の医薬組成物。

図面

図 1

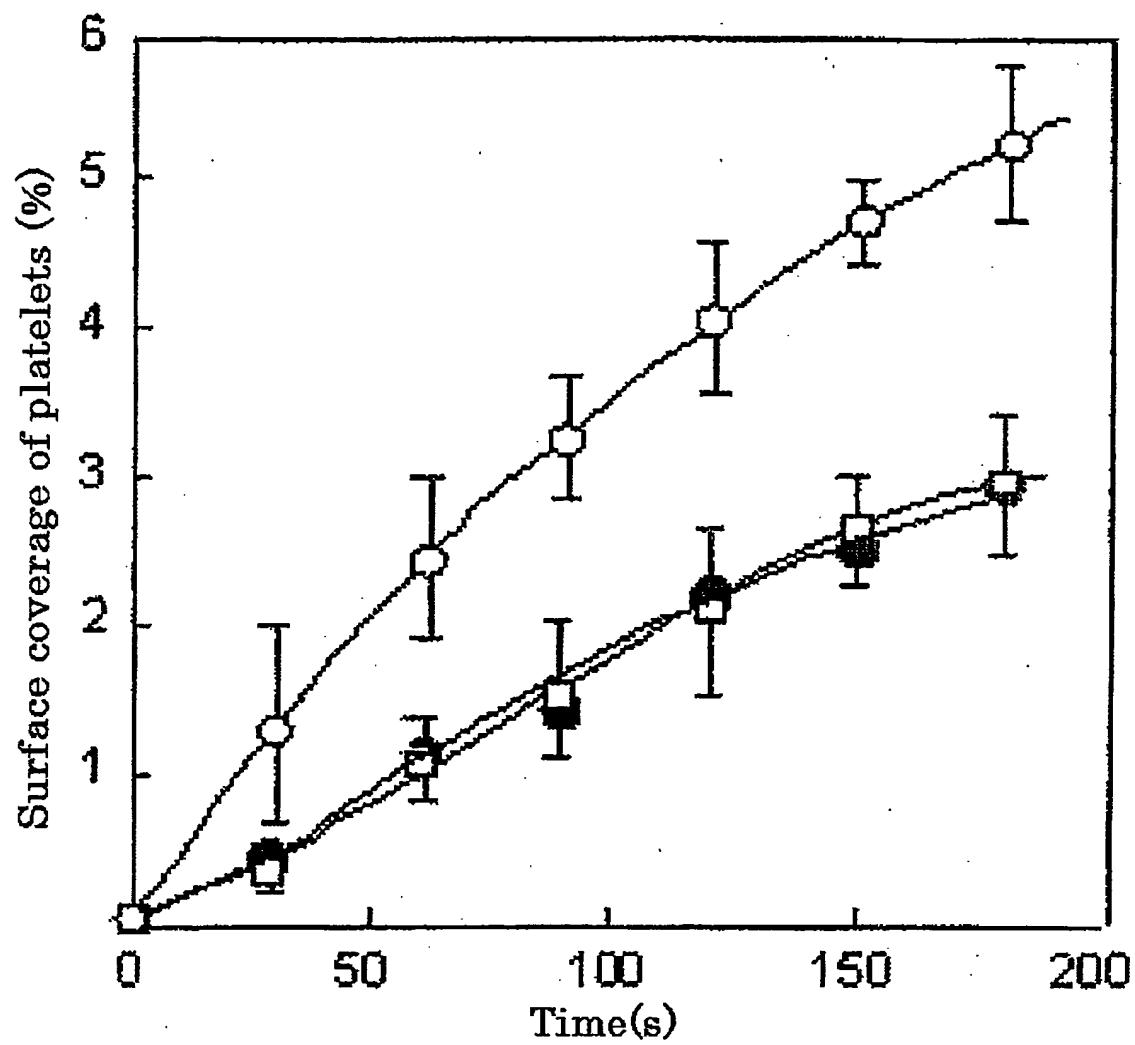


図 2

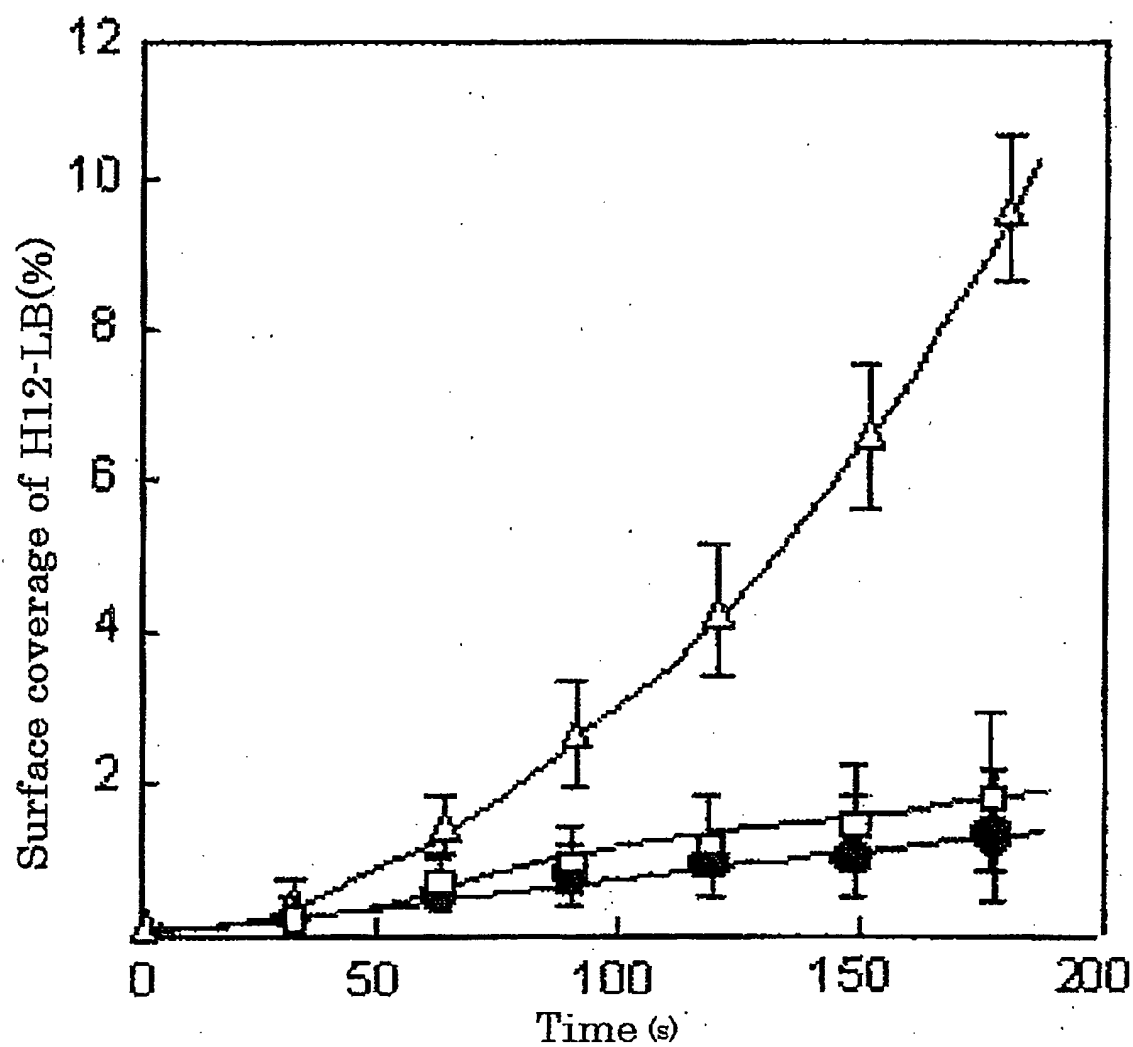


図 3

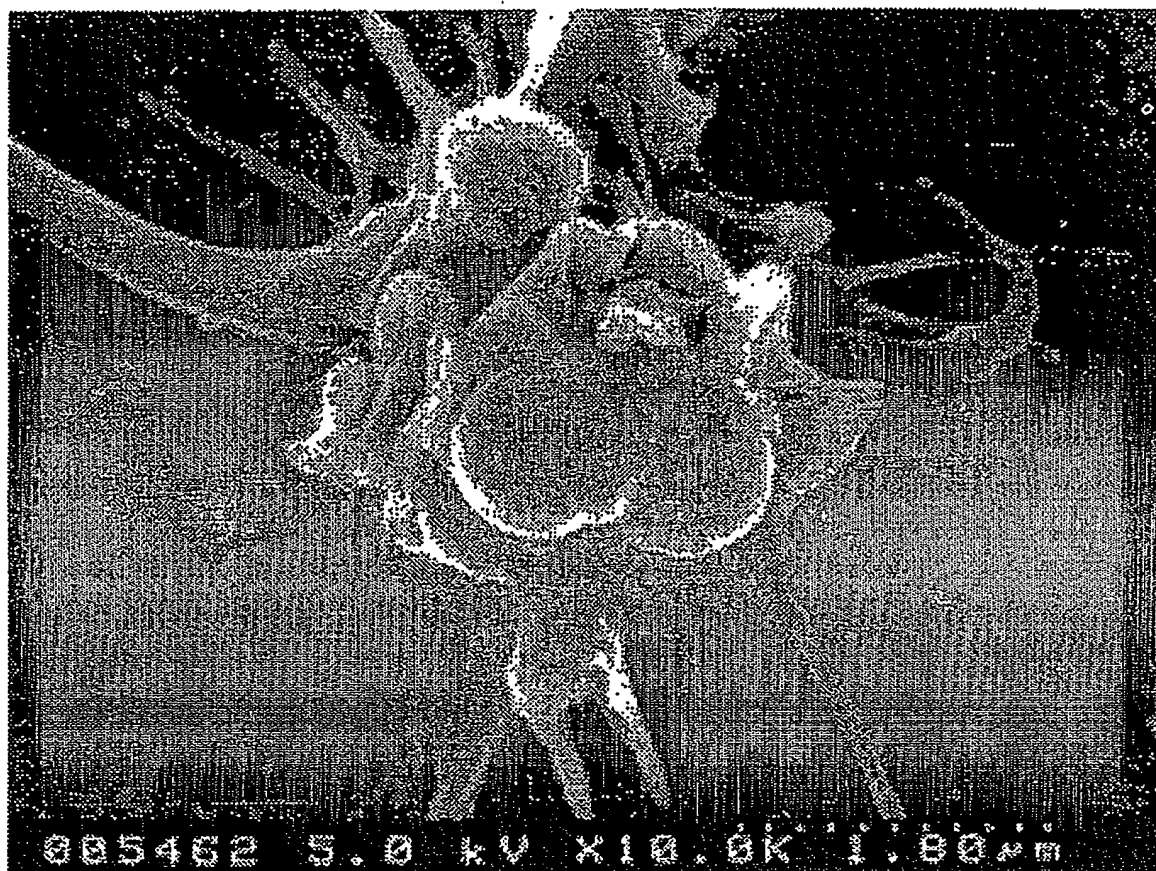


図 4

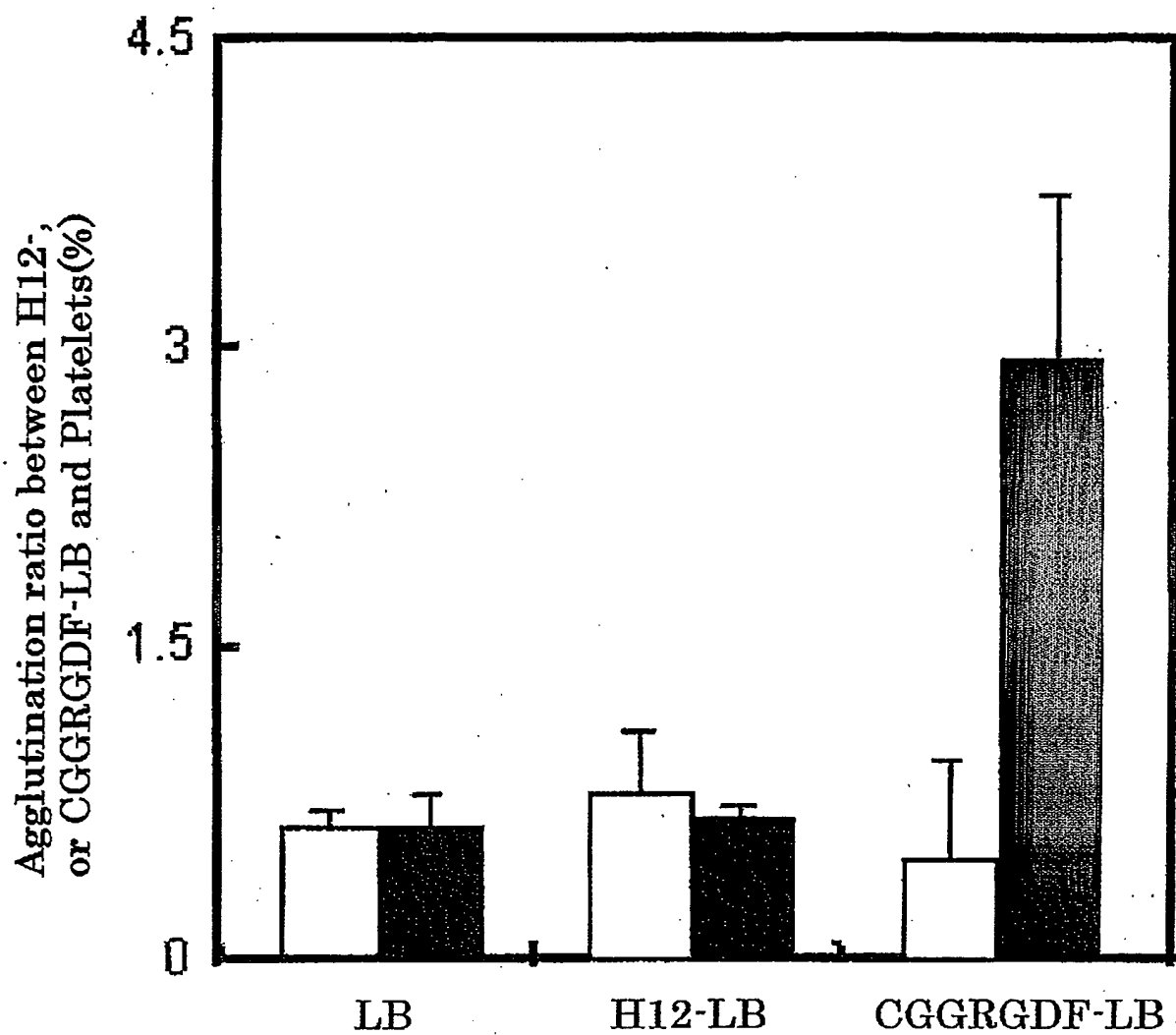


図 5

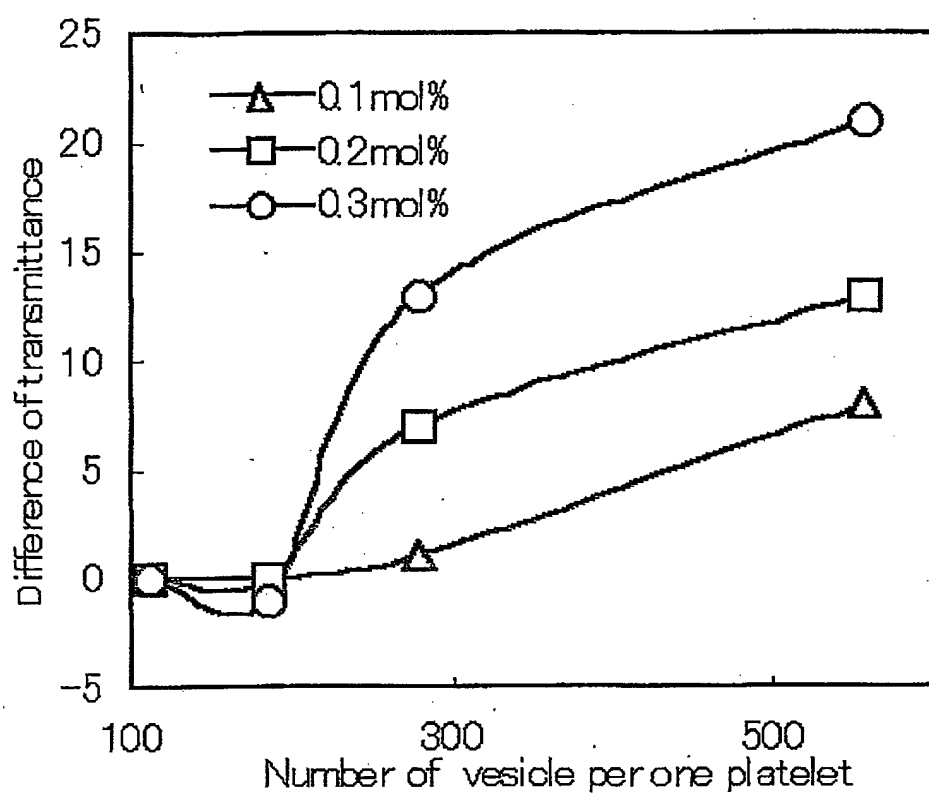
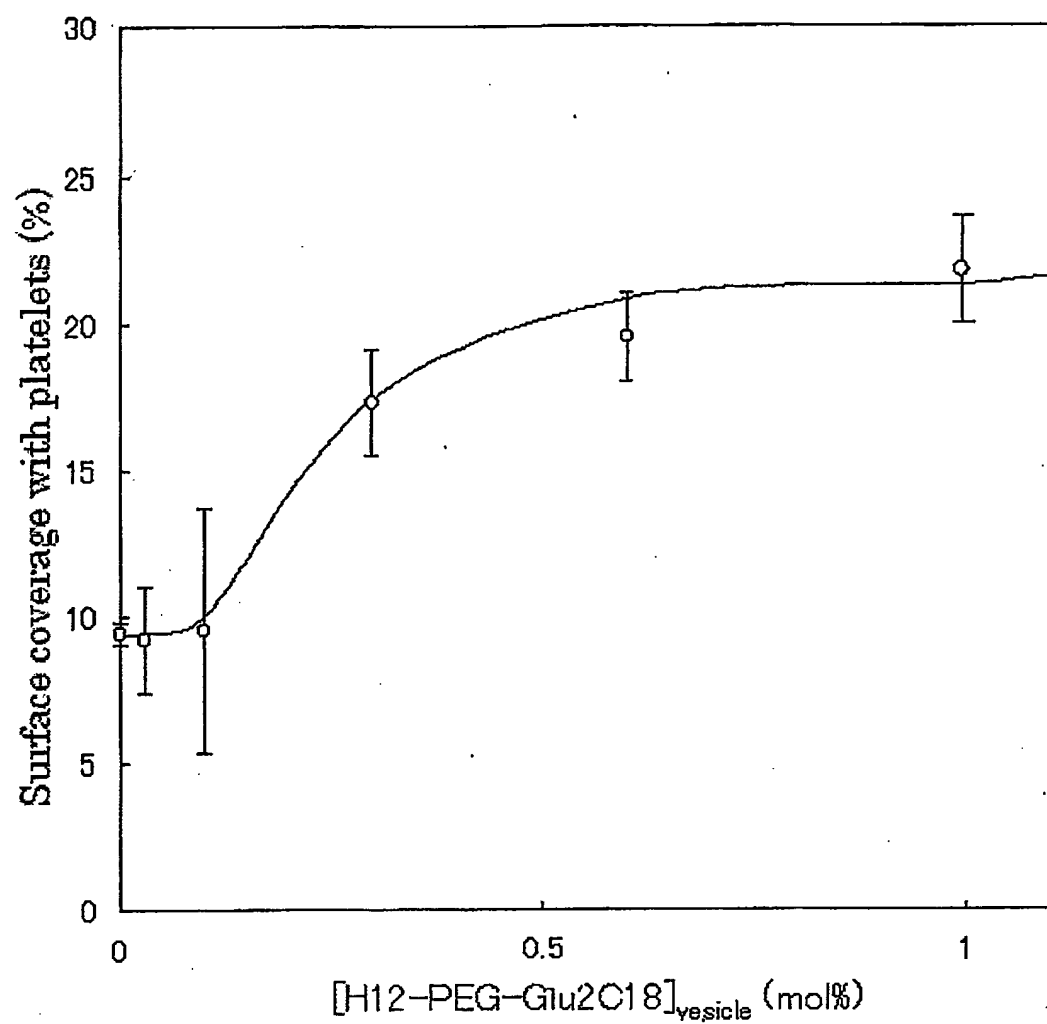


Fig 6



SEQUENCE LISTING

<110> KEIO UNIVERSITY

<110> Mitsubishi Pharma Corporation

5

<120> Peptide-conjugated material

<130> GP04-1003

10 <150> JP P2003-029847

<151> 2003-02-06

<150> JP P2004-017046

<151> 2004-01-26

15

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

20 <210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Designed peptide based on GP IIb/IIIa

<400> 1

His His Leu Gly Gly Ala Lys Gln Ala Gly Asp Val

1 5 10

5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Designed peptide based on GP IIb/IIIa

<400> 1

15

Cys Gly Gly Arg Gly Asp Phe

1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/001293

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K7/08, A61K31/80, A61P7/02, 7/04, 7/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K7/08, A61K31/80, A61P7/02, 7/04, 7/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubMed, JSTPlus (JOIS), CA/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4661471 A (NEW ENGLAND DEACONESS HOSPITAL), 28 April, 1987 (28.04.87), & EP 180595 B1	1-21
Y	Kloczewiak M., et al., Platelet receptor recognition domain on the gamma chain of human fibrinogen and its synthetic peptide analogues Biochemistry., 04 April, 1989 (04.04.89), Vol.28, No.7, pages 2915 to 2919	1-21
Y	Timmons S., et al., Antiplatelet "hybrid" peptides analogous to receptor recognition domains on gamma and alpha chains of human fibrinogen., Biochemistry., 04 April, 1989 (04.04.89), Vol.28, No.7, pages 2919 to 2923	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 April, 2004 (15.04.04)Date of mailing of the international search report
11 May, 2004 (11.05.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/001293

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yuji TERAMURA et al., "Kesshobanmaku Tanpakushitsu o Albumin Jugotai Aruiha Rin Shishitsu Kohotai ni Ketsugo Saseta Kesshoban Daitaibutsu no Hyoka", Polymer Preprints, Japan Yokoshu, 28 August, 2001 (28.08.01), Vol.50, No.14, pages 3563 to 3564	1-21
Y	Yosuke OKAMURA et al., "Fibrinogen Ketsugo Albumin Jugotai no Kesshoban Daitaibutsu toshite no Kino Hyoka", Polymer Preprints, Japan Yokoshu, 07 May, 2001 (07.05.01), Vol.50, No.5, page 1036	1-21
A	JP 2001-151800 A (Hidetoshi TSUCHIDA), 05 June, 2001 (05.06.01), (Family: none)	1-21
A	Hallahan D.E., et al., Targeting drug delivery to radiation induced neoantigens in tumor micro vasculature., J.Control.Release, 2001, Vol.74, pages 183, 191	1-21
A	EP 894807 A1 (YOSHITOMI PHARMACEUTICAL), 03 February, 1999 (03.02.99), & JP 9-208599 A & US 6177059 A & WO 97/29128 A1	1-21
A	Andrew J. et al., Development of GPIIb/IIIa antagonist as antithrombotic drugs., Trends in Pharmacological Sciences, 1992, Vol.13, pages 413 to 417	1-21
A	NISHIYA T., et al., Interaction of RGD liposomes with platelets. Biochem.Biophys.Res.Comm., 05 July, 1996 (05.07.96), Vol.224, No.1, pages 242 to 245	1-21
A	Timmons S, et al., ADP-dependent common receptor mechanism for binding of von Willebrand factor and fibrinogen to human platelets., Proc.Natl. Acad.Sci., USA., 1984, August, Vol.81, No.15, pages 4935 to 4939	1-21
P,X	TAKEOKA S., et al., Function of fibrinogen gamma-chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow., Biochem.Biophys.Res.Comm., 19 December, 2003 (19.12.03), Vol.312, No.3, pages 773 to 779	1-21

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl⁷ C07K 7/08, A61K 31/80, A61P 7/02, 7/04, 7/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl⁷ C07K 7/08, A61K 31/80, A61P 7/02, 7/04, 7/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

PubMed, JSTPlus(JOIS), CA/REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	US 4661471 A (NEW ENGLAND DEACONESS HOSPITAL) 1987.04.28 &EP 180595 B1,	1-21
Y	Kloczewiak M, et al., Platelet receptor recognition domain on the gamma chain of human fibrinogen and its synthetic peptide analogues. Biochemistry., 1989 Apr 4, vol.28, no.7, p. 2915-2919.	1-21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 04. 2004

国際調査報告の発送日

11. 5. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Timmons S, et al., Antiplatelet "hybrid" peptides analogous to receptor recognition domains on gamma and alpha chains of human fibrinogen. Biochemistry., 1989 Apr 4, vol.28, no.7, 2919-2923.	1-21
Y	寺村 裕治他, 血小板膜蛋白質をアルブミン重合体あるいはリン脂質小胞体に結合させた血小板代替物の評価. 高分子学会予稿集, 2001.08.28, vol.50, no.14, p.3563-3564.	1-21
Y	岡村陽介 他, フィブリノーゲン結合アルブミン重合体の血小板代替物としての機能評価. 高分子学会予稿集, 2001.05.07, vol.50, no.5, p.1036.	1-21
A	JP 2001-151800 A (土田 英俊) 2001.06.05 (ファミリーなし)	1-21
A	Hallahan D.E., et al., Targeting drug delivery to radiation-induced neoantigens in tumor microvasculature. J. Control. Release, 2001, vol.74, p.183-191.	1-21
A	EP 894807 A1 (YOSHITOMI PHARMACEUTICAL) 1999.02.03 &JP 9-208599 A, &US 6177059 A, &WO 97/29128 A1	1-21
A	Andrew J. et al., Development of GPIIb/IIIa antagonists as antithrombotic drugs. Trends in Pharmacological Sciences, 1992, vol.13, p.413-417.	1-21
A	Nishiya T, et al., Interaction of RGD liposomes with platelets. Biochem.Biophys.Res.Comm., 1996 Jul 5, vol.224, no.1, p.242-245.	1-21
A	Timmons S, et al., ADP-dependent common receptor mechanism for binding of von Willebrand factor and fibrinogen to human platelets. Proc Natl Acad Sci U S A., 1984 Aug, vol.81, no.15, p.4935-4939.	1-21
PX	Takeoka S, et al., Function of fibrinogen gamma-chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow. Biochem.Biophys.Res.Comm., 2003 Dec 19, vol.312, no.3, p.773-779.	1-21

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.